

Càtedra
AgroBank



**TESIS GANADORA DEL “II PREMIO CÁTEDRA AGROBANK
A LA MEJOR TESIS DOCTORAL”**



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia
d'Aliments

New advances in the control
of brown rot in stone fruit using
the biocontrol agent
Bacillus amyloliquefaciens CPA-8



Amparo María Gotor Vila

PhD Thesis
Lleida, July 12th 2017

RESUMEN DE LA TESIS GANADORA DEL “II PREMIO CÁTEDRA AGROBANK A LA MEJOR TESIS DOCTORAL”

Autora: Dra. Amparo M^a Gotor Vila.

Directores: Dra. Neus Teixidó Espasa y Dr. Josep Usall Rodié.

Título: *New advances in the control of brown rot in stone fruit using the biocontrol agent Bacillus amyloliquefaciens CPA-8.*

La podredumbre marrón causada por el hongo *Monilinia* spp. es responsable de importantes pérdidas en la poscosecha de la fruta de hueso, alcanzando el 80 % de la producción cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables para el desarrollo de la enfermedad, especialmente en variedades de maduración tardía. Hasta la fecha, el uso de fungicidas sintéticos sigue siendo la forma más eficaz para prevenir enfermedades fúngicas, causantes de tan graves pérdidas en la producción de diferentes cultivos. Sin embargo, la lista de productos autorizados en Europa para uso en poscosecha es muy limitada. Además, existe una gran conciencia social respecto a la sostenibilidad de las prácticas agrícolas; que junto al incremento de la producción ecológica y la necesidad de prevenir la aparición de cepas fúngicas resistentes a fungicidas, ha promovido la búsqueda de métodos alternativos que impliquen una reducción en el número de aplicaciones químicas en el campo.

Entre los métodos de control, la aplicación de estrategias respetuosas con el medio ambiente, tales como las que utilizan agentes de biocontrol (ABCs), solos o en combinación con tratamientos físico-químicos, se ha tenido enormemente en cuenta durante las últimas décadas por científicos y empresas de todo el mundo. Sin embargo, tales prácticas aún no se aplican de manera rutinaria en la industria frutícola.

Recientemente se ha demostrado la capacidad antagonista de la cepa CPA-8 de *Bacillus amyloliquefaciens* (aislado de la microbiota del melocotón), el cual es capaz de controlar la podredumbre marrón del melocotón causada por el hongo *Monilinia* spp. Dicha habilidad se debe principalmente a su capacidad de producir lipopéptidos del grupo de las fengicinas. No obstante, a pesar de las habidas publicaciones que describen diferentes microorganismos eficaces en el control de enfermedades de poscosecha, la cantidad de productos basados en ABCs disponibles en el mercado es considerablemente baja. Por lo tanto, **el objetivo principal de esta tesis es completar el desarrollo del ABC *B. amyloliquefaciens* CPA-8 para así**

obtener un producto eficaz que proporcione una estrategia comercial viable para el control de la podredumbre marrón de la fruta de hueso.

En primer lugar, se diseñaron dos marcadores para detectar e identificar molecularmente el ABC CPA-8. Para ello se elaboró una colección de 77 cepas de *Bacillus* spp., incluyendo individuos con diferente grado de similitud filogenética. En un primer enfoque, el marcador SCAR-4 (basado en la metodología RAPD) amplificó un fragmento semiespecífico de 665 pb, el cual no sólo dio positivo para la cepa CPA-8, sino también para otras 12 cepas (todas ellas morfológicamente diferentes a CPA-8 y fácilmente distinguibles previamente a la amplificación del ADN). En consecuencia, se desarrolló un segundo marcador (265 pb) mucho más preciso a partir del gen *RBAM 007760*. Dicho gen está implicado en la adaptación ecológica de la bacteria, principalmente en la adhesión superficial bacteriana y varía notablemente entre especies e incluso cepas similares. Paralelamente, se estudió la particularidad genética del gen *trp E*, pero quedó descartado durante el trabajo. A raíz de dicho estudio, los conocimientos adquiridos en la genética de CPA-8 permitieron demostrar que esta cepa está estrechamente relacionada con especies del grupo *B. amyloliquefaciens* en lugar de *B. subtilis* (el cual fue su primer nombre en la literatura).

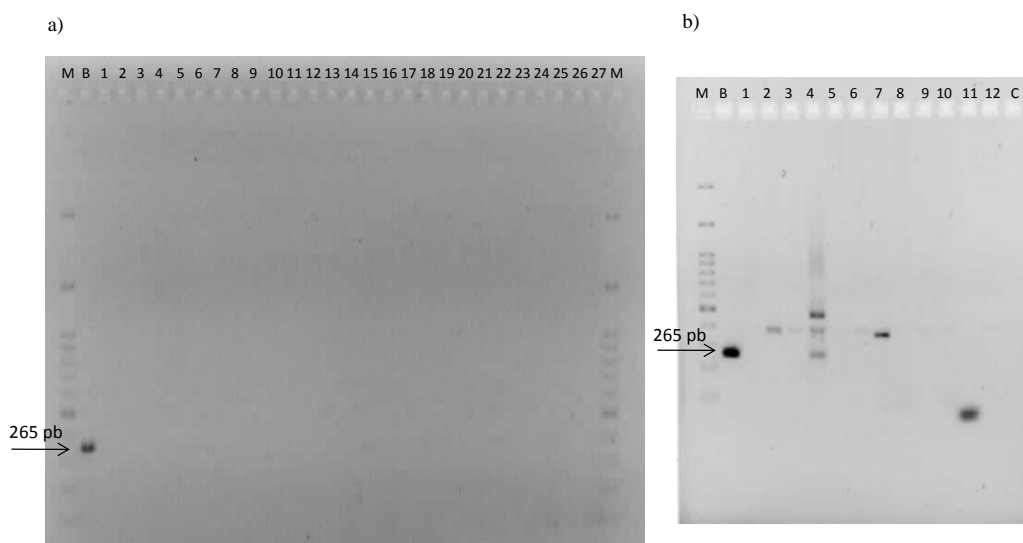


Figura 1. Ejemplo del marcador gen-específico de CPA-8 obtenido con la pareja de cebadores F2/R2 del gen *RBAM 007760* (a). Ejemplo de cómo este marcador permite distinguir entre aquellas cepas (no diana) positivas para el marcador SCAR-4 (b). Las flechas indican la amplificación del marcador para CPA-8 en un subconjunto de cepas de la colección.

A continuación, y con el propósito de conocer mejor el microorganismo en cuestión, se realizaron una serie de trabajos que permitieron caracterizar en gran medida la biología y fisiología de la cepa CPA-8. Se describió la capacidad de CPA-8 para crecer en diferentes condiciones de temperatura- pH y de temperatura-actividad de agua (a_w). Para ello, los datos obtenidos tras el análisis espectrofotométrico (medida del crecimiento bacteriano a

partir de la luz absorbida a $\lambda = 700$ nm) fueron analizados aplicando la modelización primaria sigmoidea de Baranyi & Roberts (1994), estimando así el ratio de máximo crecimiento (h^{-1}) y la duración de la fase de retardo “lag” (h). Los resultados revelaron que mientras que CPA-8 no pudo crecer a pH inferior a 4.5, el crecimiento óptimo se observó a 37 °C y pH entre 7 y 5. Además, el tipo de soluto (glucosa o glicerol) utilizado para reducir la a_w tuvo una gran influencia en la mínima a_w en la cual la bacteria pudo crecer. La a_w más baja para el crecimiento de CPA-8 en medios modificados con glicerol y glucosa fue de 0.950 y 0.960, respectivamente. Sin embargo, a 20 °C, CPA-8 no fue capaz de crecer a menos de 0.990 a_w , independientemente del tipo de soluto utilizado para modificar el medio. Continuando con la caracterización de CPA-8, también se realizaron pruebas para determinar su susceptibilidad y/o resistencia a diferentes antibióticos. Los resultados indicaron que CPA-8 era claramente resistente a la higromicina. Además, se realizó un ensayo (basado en amplificación por PCR) para detectar la presencia de genes enterotóxicos (complejo proteico HBL “Hemolisina BL” y complejo proteico no hemolítico “NHE”) propios de *Bacillus cereus* en CPA-8. *B. cereus* ha sido tradicionalmente considerado como la especie más problemática del género *Bacillus* en la industria alimentaria debido a su capacidad de producir enterotoxinas que pueden provocar diarrea y vómitos en los consumidores. Dicho estudio demostró que el complejo HBL no está presente en CPA-8 y que, pese a que el gen *nheA* (del complejo NHE) amplificó en CPA-8, esto no es suficiente para la expresión de toxicidad, sugiriendo así que esta cepa no es un patógeno de transmisión alimentaria.

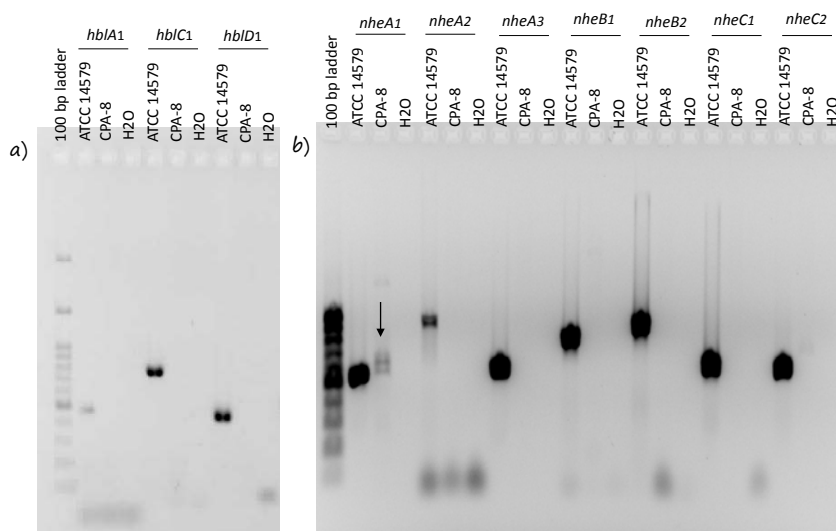


Figura 2. Productos amplificados a partir de los cebadores de los genes enterotóxicos de *B. cereus*: a) complejo HBL y b) complejo NHE. Los genes diana están indicados en la figura y los subíndices indican la bibliografía de dónde se obtienen los cebadores y condiciones de amplificación: (1) Hansen and Hedriksen, 2001; (2) Ngamwongsatit et al. (2008), and (3) Kumar et al. 2010, and. La amplificación de CPA-8 para el gen *nheA1* se indica con una flecha.

Continuando con la caracterización de la cepa CPA-8, se contempló la posibilidad de que ésta demostrara diferentes modos de acción al previamente descrito (producción de fengicinas). En este trabajo, se demostró el efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por CPA-8 contra *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* y *Botrytis cinerea*. Dichos compuestos se evaluaron con un ensayo de doble placa petri para analizar su efecto en el crecimiento micelial y en el número de colonias crecidas de cada patógeno diana tras ser co-incubado con CPA-8 en diferentes condiciones (ensayos *in vitro*); a continuación, también se estudió el efecto de los VOCs en cerezas inoculadas artificialmente con los patógenos mencionados (ensayos *in vivo*). Además, los principales volátiles emitidos por CPA-8 se identificaron mediante cromatografía de gases en fase sólida de microextracción (SPME) como 1,3 pentadieno, acetoina (3-hidroxi-2-butanona) y tiofeno.

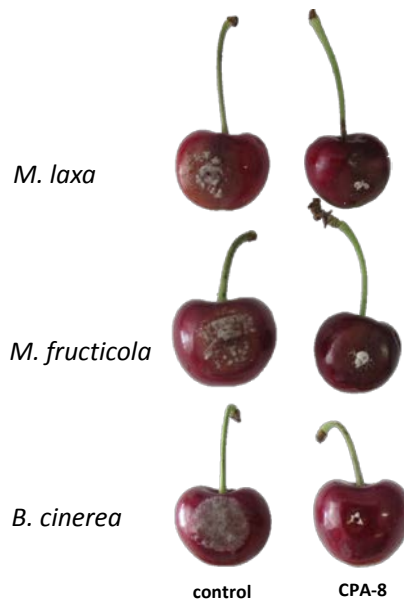


Figura 3. Efecto de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por la cepa CPA-8 cultivado en medio TSA, del inglés Triptone Soy Agar, en cerezas artificialmente inoculadas con *M. laxa*, *M. fructicola*, y *B. cinerea*.

Sin embargo, y **atendiendo al complejo proceso que conlleva la comercialización de productos de biocontrol, uno de los principales cuellos de botella es el desarrollo de formulaciones que puedan ser almacenadas de manera estable sin perder eficacia.** La formulación de un microorganismo debe ser económica de producir, fácil de distribuir, contener suficientes unidades formadoras de colonias (UFCs) y tener una larga vida útil (preferentemente almacenados a temperatura ambiente durante 6-24 meses). **Para ello, se quiso mejorar el medio de producción utilizado hasta la fecha, evaluando así tres fuentes de nitrógeno diferentes.** El medio de cultivo basado en el aislado proteico de soja PROSTAR 510A (20 g L⁻¹) proporcionó la mejor curva de crecimiento de CPA-8, en comparación con el extracto hervido de harina de soja desengrasada (DSF) y el extracto proteico PROSTAR 510A (10 g L⁻¹).

De esta forma se evitaron los inconvenientes que causaba el medio DSF crudo (utilizado en trabajos previos a esta tesis) el cual implicaba un alto índice de contaminación por la alta carga microbiana de la harina y además presentaba complicaciones en su elaboración por su baja solubilidad en agua y la formación de grumos. Una vez mejorado el medio, **se estudió la capacidad de CPA-8 para producir endosporas en las nuevas condiciones de producción.** Estas estructuras permiten al microorganismo sobrevivir en condiciones hostiles tales como la las elevadas temperaturas alcanzadas en el proceso de secado. Se observó que la producción de endosporas de CPA-8 está altamente relacionada con la edad del cultivo (la cantidad producida aumentaba considerablemente conforme el tiempo de cultivo era más largo, de 24 a 72 h), llegando a obtener una concentración superior a 10^8 UFC mL⁻¹.

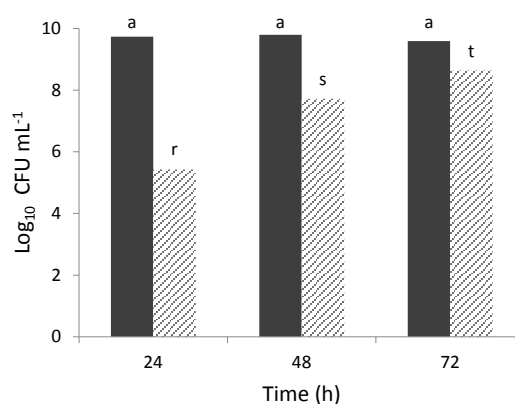


Figura 4. Producción de endosporas de CPA-8 cultivado en medio de cultivo con la proteína PROSTAR 510A 20 g L⁻¹ durante 24, 48 y 72 h. La figura muestra las UFC de CPA-8 antes (■) y tras ser expuestas a un baño de agua a 80 °C durante 12 minutos (▨). Diferentes letras indican diferencias estadísticas de acuerdo al test Tukey's HSD ($P < 0.05$).

La siguiente etapa se centró en la evaluación y comparación de tres tecnologías diferentes para la formulación de CPA-8: líquida, liofilización y secado por lecho fluido-atomización. Además, se evaluó el efecto de diferentes protectores en la viabilidad, la estabilidad y la actividad antagonista de CPA-8. Aunque finalmente se obtuvieron concentraciones satisfactorias tanto para los productos líquidos ($1.9 \cdot 10^9$ - $2.9 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹) como para los productos secos ($4.8 \cdot 10^9$ - $1.0 \cdot 10^{10}$ UFC g⁻¹), se consideró que la tecnología de secado por lecho fluido-atomización era la más adecuada para el desarrollo de productos basados en CPA-8 estables y eficaces para posteriores aplicaciones prácticas. Esta tecnología innovadora (usada generalmente en la industria farmacéutica) permite emplear temperaturas no muy elevadas para obtener una cantidad considerable de un producto de muy buena dispersión, sin la necesidad de extrusión previa y de una manera rápida y económica. **Una vez que se definió el mejor proceso de secado para la formulación de CPA-8, fue necesaria una posterior optimización de algunos parámetros y así obtener un mayor rendimiento. En particular, este trabajo se centró en el efecto de los protectores y de los materiales de soporte empleados durante la fluidificación.** El uso de los protectores 20 % de sacarosa más

10 % de leche en polvo resultó ser la mejor combinación para formular CPA-8 tanto cuando se usó maltodextrina como substrato como cuando se usó el almidón de patata. Estos dos productos (que de ahora en adelante se denominarán BA3 -formulados con maltodextrina-, y BA4 -formulados con almidón de patata-) fueron seleccionados para posteriores ensayos de vida útil y eficacia. Los resultados revelaron que la viabilidad de CAP-8 se mantuvo estable después de 15 meses de almacenamiento a 4 y 22 °C, obteniendo concentraciones entre $7.8 \cdot 10^9$ y $1.2 \cdot 10^{10}$ UFC g^{-1} . Además, la eficacia de estos dos productos formulados frente a *Monilinia* spp. se demostró en una gran variedad de fruta de hueso: melocotones, nectarinas, paraguayos, cerezas, albaricoques y ciruelas.

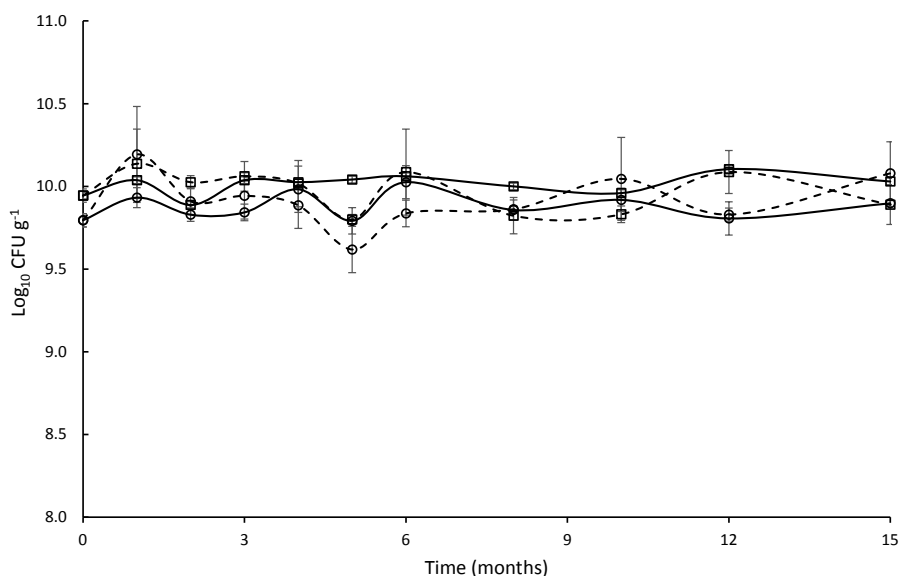


Figura 5. Vida útil de los productos de CPA-8 tras su almacenamiento durante 15 meses a diferente temperatura: producto BA3 almacenado a 4 (—○—) y 22 °C (-○-) y producto BA4 almacenado a 4 (-□—) y 22 °C (-□-). Los valores son la media de tres determinaciones y las barras indican la desviación estándar.



Figura 6. Ejemplo de la eficacia de los productos de CPA-8 optimizados en nectarinas artificialmente inoculadas con *M. laxa*. Izquierda: control, centro: producto BA3 y derecha: producto BA4.

Posteriormente, se estimó la dinámica poblacional de CPA-8 en la superficie de nectarinas y melocotones una vez tratados con los productos formulados de CPA-8 (BA3 y BA4) y expuestos a diferentes condiciones ambientales. CPA-8 demostró una amplia tolerancia a diferentes valores extremos de temperatura, humedad relativa y lluvia (siendo éste último el factor más restrictivo). La población mínima de CPA-8 obtenida después de la exposición fue en la mayoría de los casos superior a 10^4 UFC cm^{-2} de superficie del fruto, garantizando así una buena cobertura del tratamiento (y por ende mayor biocontrol). Los resultados también indicaron que los melocotones proporcionaron, por lo general, un mejor nicho ecológico que las nectarinas para el mantenimiento de CPA-8 sobre la superficie del fruto. Además, las propiedades de los dos productos formulados (principalmente en relación a su solubilidad en agua) influyeron enormemente en la dinámica poblacional de CPA-8 sobre la fruta, sugiriendo que el producto formulado BA4 favoreció una mayor supervivencia de CPA-8.



Figura 7. Montaje para la simulación de lluvia en el estudio de la dinámica poblacional de los productos de biocontrol en la superficie de la fruta. El simulador consiste en una caja metálica (100x50x20 cm) con agujas hipodérmicas en la base que generan un sistema de goteo en función de la presión de la columna de agua contenida en la caja.

Por último, para el desarrollo de ABCs comercialmente funcionales, es necesario realizar ensayos en condiciones reales de campo, incluyendo experimentos en cultivo completo (y no sólo en frutos). Para ello, la última parte de esta tesis tuvo como objetivo evaluar el potencial de diferentes formulaciones de CPA-8 en el control de la podredumbre marrón en campos comerciales de melocotón. **Específicamente se estudió la dosis de tratamiento de CPA-8, la dinámica poblacional de CPA-8 una vez aplicado en campo y la eficacia de CPA-8 en el control de *Monilinia* spp., tanto en el momento de la cosecha como en la poscosecha.** Los resultados demostraron que, dependiendo de la presión de la enfermedad (principalmente condicionada por la meteorología) se obtuvo un grado variable de control biológico. Bajo una alta incidencia de *Monilinia* spp. en campo (>50 %), sólo el tratamiento

químico pudo controlar la enfermedad en poscosecha (en cosecha ni siquiera el químico demostró efecto comparado con el control). Sin embargo, cuando la presencia del patógeno se engloba dentro de los límites estándares registrados en la zona (5.3 y 17.3 % de incidencia de *Monilinia* spp. en cosecha y poscosecha, respectivamente), los tratamientos basados en formulaciones de CPA-8 demostraron ser eficaces. En la cosecha, los productos BA3 y BA4 redujeron considerablemente la incidencia de *Monilinia* spp. (aunque menos que los productos químicos). Además, el tratamiento con el producto BA4 redujo eficazmente la enfermedad en poscosecha e incluso estadísticamente similar a las aplicaciones químicas. **También se evaluó la eficacia de CPA-8 una vez aplicado junto con otros ABCs.** En este caso se escogió *Penicillium frequentans*, el cual ya había sido descrito como antagonista de *Monilinia* spp. Sin embargo, tal combinación no aumentó la eficacia de CPA-8. Además, se demostró la persistencia de CPA-8 en la superficie del fruto desde que se aplicó el tratamiento hasta la cosecha y posterior poscosecha.

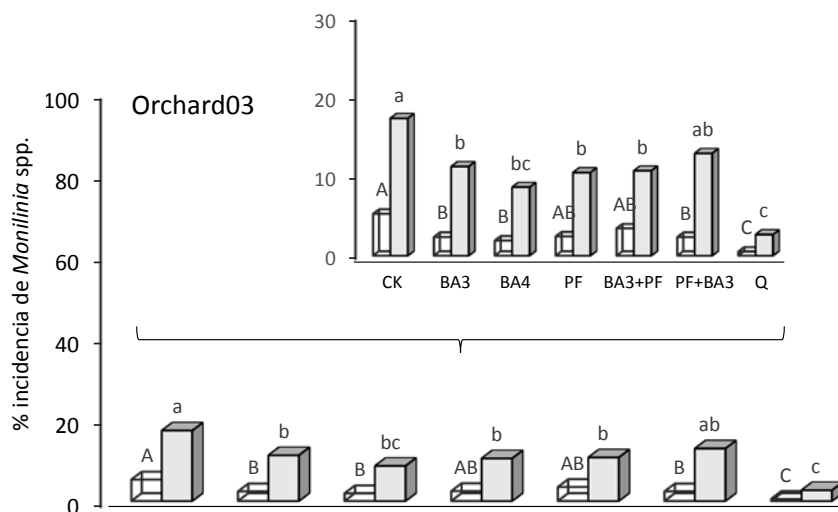


Figura 8. Eficacia de los tratamientos basados en CPA-8 (BA3 y BA4) solos o en combinación con el agente de biocontrol *P. frequentans* (PF) frente a la incidencia de *Monilinia* spp. (%) en cosecha (□) y poscosecha (■). Como control se evaluó árboles no tratados (CK) y tratamiento a base de productos químicos (Q). Diferentes letras indican diferencias estadísticas de acuerdo al test Tukey's HSD ($P < 0.05$).



Figura 9. Imágenes correspondientes a diferentes fases a lo largo de los ensayos de campo: aplicación del tratamiento, evaluación de los resultados en período de cosecha y almacenamiento de la fruta para su evaluación en poscosecha.

Finalmente esta tesis incluye **un exhaustivo estudio sobre la monitorización del comportamiento de la cepa CPA-8** tras su aplicación en un campo de paraguay. Se contemplaron los frutos, las hojas y la yerba circundante tanto de un árbol tratado como de aquellos que lo rodean a diferentes distancias. Para ello se utilizaron técnicas de gravimetría, papeles hidrosensibles y la estimación de la población de CPA-8 mediante técnicas de cultivo y moleculares. Este trabajo demostró una buena distribución, persistencia y adaptación de la cepa CPA-8 no sólo en el campo sino también en condiciones de poscosecha. Estos datos, además de proporcionar información para un mejor diseño de programas para el control de la enfermedad, proporcionan información crucial para la fase de registro del producto.

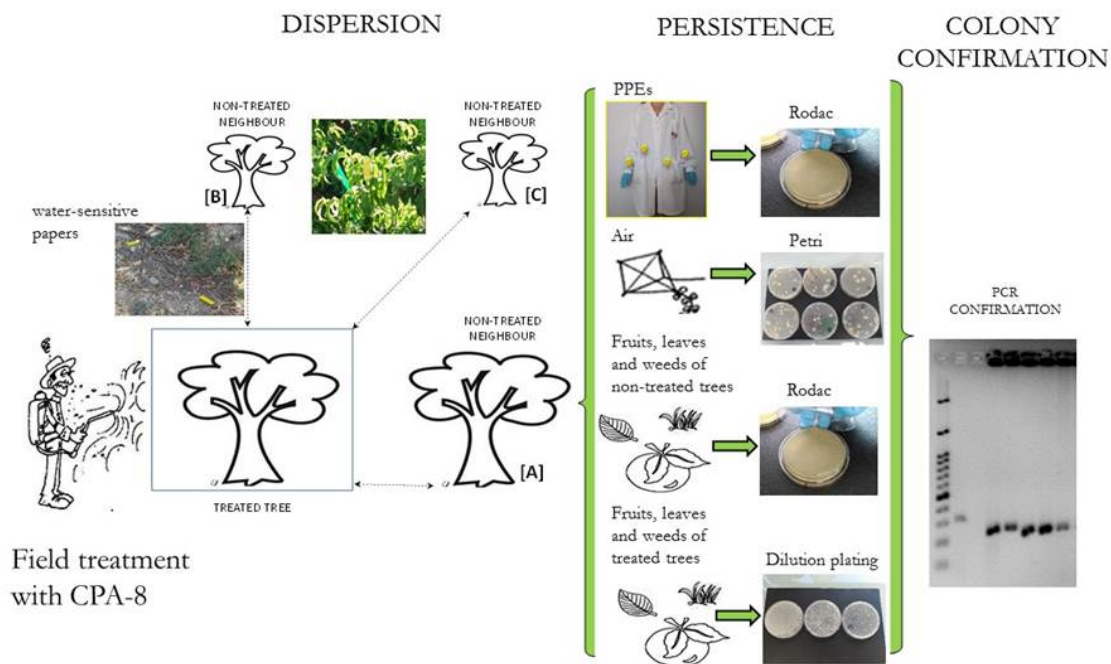


Figura 10. Esquema ilustrado de la metodología empleada para el estudio de la dispersión y adaptación de CPA-8 en campo.

Finalmente añadir, tal y como contempla la discusión de la tesis aquí resumida, que todavía hay en curso interesantes trabajos que nos ayudarán a elucidar el comportamiento de la cepa CPA-8. Brevemente comentar que la estrategia de aplicación en campo se está validando en campos comerciales distribuidos en Francia, Italia, Bélgica y España, principales países europeos productores de fruta de hueso. Además, como colofón a los estudios sobre producción y formulación de este microorganismo, se están evaluando diferentes estrategias de envasado, teniendo en cuenta el material empleado, la atmosfera de conservación, así como la temperatura para su mejor distribución y almacenaje.

En conclusión, los datos obtenidos en esta tesis permiten confirmar el potencial del ABC *B. amyloliquefaciens* CPA-8 como una alternativa eficaz en el control de *Monilinia* spp. Se han obtenido dos productos basados en CPA-8, los cuales se encuentran en la última etapa de su desarrollo comercial, a falta de la fase de registro. La integración de estos productos en los sistemas de cultivo habituales puede ser una estrategia prometedora para conseguir un mayor nivel de control de la podredumbre marrón, contribuyendo así en el manejo de las enfermedades de poscosecha en fruta de hueso en el marco de una agricultura sostenible y/o ecológica.